

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2001-112437

(P2001-112437A)

(43)公開日 平成13年4月24日 (2001.4.24)

(51)Int.Cl.<sup>7</sup>  
A 2 3 L 1/28  
A 2 3 C 9/12  
C 1 2 N 1/20  
// (C 1 2 N 1/20  
C 1 2 R 1:01)

識別記号

F I  
A 2 3 L 1/28  
A 2 3 C 9/12  
C 1 2 N 1/20  
(C 1 2 N 1/20  
C 1 2 R 1:01)

テ-レコ-ド(参考)  
Z 4 B 0 0 1  
4 B 0 1 8  
A 4 B 0 6 5  
A

審査請求 未請求 請求項の数4 OL (全8頁)

(21)出願番号 特願平11-295300

(22)出願日 平成11年10月18日 (1999.10.18)

(71)出願人 000006884

株式会社ヤクルト本社  
東京都港区東新橋1丁目1番19号

(72)発明者 辻 浩和

東京都港区東新橋1丁目1番19号 株式会  
社ヤクルト本社内

(72)発明者 島川 康久

東京都港区東新橋1丁目1番19号 株式会  
社ヤクルト本社内

(74)代理人 100068700

弁理士 有賀 三幸 (外4名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ピフィドバクテリウム属細菌含有飲食品の製造方法

(57)【要約】 (修正有)

【課題】 発酵乳やヨーグルト等の製品中での生残率が  
高いピフィドバクテリウム属細菌含有飲食品の経済的な  
製造法を提供すること。

【解決手段】 ピフィドバクテリウム属細菌の培養途中  
に、該細菌の代謝を停止させずに増殖速度を低下させる  
工程を導入することを特徴とするピフィドバクテリウム  
属細菌含有飲食品の製造方法。

(2)

2

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 ビフィドバクテリウム属細菌の培養途中に、該細菌の代謝を停止させずに増殖速度を低下させる工程を導入することを特徴とするビフィドバクテリウム属細菌含有飲食品の製造方法。

【請求項2】 ビフィドバクテリウム属細菌の代謝を停止させずに増殖速度を低下させる工程が次の (a) ~

(d)

(a) 培養液中の溶存酸素量を増加させる工程

(b) 培養液の温度を変化させる工程

(c) 培養液の浸透圧を変化させる工程

(d) 培養液のpHを変化させる工程

から選ばれる1又は2以上である請求項1記載の製造方法。

【請求項3】 ビフィドバクテリウム属細菌の代謝を停止させずに増殖速度を低下させる工程が次の (a) ~

(d)

(a) 培養途中の溶存酸素量を3 ppm乃至飽和状態にまで増加させる工程

(b) 培養液の温度を元の培養温度から3~14℃変化させる工程

(c) 培養液の浸透圧を元の浸透圧から150~800 mOsm変化させる工程

(d) 培養液のpHを元のpHから0.3~3変化させる工程

から選ばれる1又は2以上である請求項1記載の製造方法。

【請求項4】 請求項1、2又は3記載の方法により得られたビフィドバクテリウム属細菌を含有する飲食品。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、優れた生理活性を有するビフィドバクテリウム属細菌の生残性が改善された飲食品の製造方法及びこの方法により得られるビフィドバクテリウム属細菌含有飲食品に関するものである。

## 【0002】

【従来の技術】ビフィドバクテリウム属細菌は人の大腸に多く成育し、整腸効果や病原菌の抑制効果が認められている細菌である。このため、発酵乳や固形ヨーグルトなど多くの飲食物に利用されている。

【0003】しかしながら、ビフィドバクテリウム属細菌は一般的に酸素や低pHに弱いので、製品化後の生菌数を維持することが困難である。例えばビフィドバクテリウム属細菌を含有する飲食物を通気性の容器に充填すると、酸素の影響を受け、製品保存時にその菌数が減少してしまう。また、発酵乳のような低pH域の製品中ではビフィドバクテリウム属細菌の菌数が、保存中に減少してしまうという問題がある。更に製品化する際、シロップ等を加えるため、浸透圧による菌数の減少及び温度による菌数の減少という問題もある。このように発酵乳等に

製品化した後に菌数が減少してしまうと、発酵乳等のビフィドバクテリウム属細菌の生理作用が減退することになる。このため、製品保存時の菌数維持が重要な課題となっており、通常はアルミを蒸着した紙パックや、ガラス容器等を容器素材として使用し、容器内を嫌気状態に保つ試み等がなされている。しかし容器の充填時の酸素の影響はまぬがれない。

【0004】また、一方ではビフィドバクテリウム属細菌の生残性を改善する方法が提案されている。例えば、特公昭57-4291号公報にはソルビトールを発酵乳1Lあたり0.2~1.0モル添加するビフィドバクテリウム属細菌の生残性改善方法が開示されている。また、特開平6-253734号公報にはエリスリトールを生残性改善剤として添加する方法が開示されている。

【0005】しかしながら、このようなビフィドバクテリウム属細菌の生残性改善剤の添加は、製造コストの上昇を招くうえに、その生残性改善効果には改善の余地が残っており、より実用性の高い生残性改善策の提供が求められている。

【0006】更に、近年では、自然な風味が嗜好される傾向が強く、添加剤等を使用しないで生残性を改善する製造法が要求されている。

## 【0007】

【発明が解決しようとする課題】従って、本発明の目的は、発酵乳やヨーグルト等の製品中での生残率が高いビフィドバクテリウム属細菌含有飲食品の経済的な製造法を提供することにある。

## 【0008】

【課題を解決するための手段】斯かる実状に鑑み本発明者は鋭意研究を行った結果、ビフィドバクテリウム属細菌の培養途中、該細菌の代謝を停止させずに増殖速度を低下させる工程を加えれば、その後の生残率が高い細菌含有飲食品が得られることを見出し本発明を完成した。

【0009】すなわち、本発明は、ビフィドバクテリウム属細菌の培養途中に、該細菌の代謝を停止させずに増殖速度を低下させる工程を導入することを特徴とするビフィドバクテリウム属細菌含有飲食品の製造方法及びこの製造方法により得られた該細菌を含有する飲食品を提供するものである。

## 【0010】

【発明の実施の形態】本発明において、ビフィドバクテリウム属細菌の代謝を停止させずに増殖速度を低下させる工程とは、ビフィドバクテリウム属細菌培養時の最適条件が定まっている各種の環境要因、すなわち、浸透圧、培地pH、溶存酸素濃度、培養温度等を、菌の代謝を止めない範囲内で、通常の培養条件から変化させる工程のことである。通常、これらの環境要因を悪化させるとビフィドバクテリウム属細菌が傷害を受け、その死滅が促進されるものと考えられているため、それらを故意に与える工程がビフィドバクテリウム属細菌含有飲食品の

(3)

3

製造時に適用されることはなかった。因に通常の培養条件は菌種によって異なるが、一般的には浸透圧 150～900mOsm (ミリオズモ)、pH 4.0～7.0、溶存酸素濃度 0～2 ppm、培養温度 30～39℃程度である。

【0011】しかしながら、このような工程を培養途中に導入することにより、ビフィドバクテリウム属細菌の生残性が改善され、特にこれを含有する飲食品中の生残性がよいことを本発明者は見出した。

【0012】ビフィドバクテリウム属細菌の代謝を停止させずに増殖速度を低下させる工程としては、次のものが挙げられる。

- (a) 培養液中の溶存酸素量を増加させる工程
- (b) 培養液の温度を変化させる工程
- (c) 培養液の浸透圧を変化させる工程
- (d) 培養液のpHを変化させる工程

これらは、いずれか1つでも、2以上の組みあわせであってもよい。なお、その他の工程としては、胆汁溶液等界面活性作用を有する物質を添加する工程等が挙げられる。

【0013】上記工程の適用時期は制限されず、ビフィドバクテリウム属細菌致達菌数と培養時間を考慮して決定すればよいが、培養の後期、一般にビフィドバクテリウム属細菌の菌体濃度が  $1 \times 10^7$  cfu/ml～ $1.5 \times 10^9$  cfu/ml、特に  $7 \times 10^7$  cfu/ml～ $1.5 \times 10^9$  cfu/ml程度となる時期に適用することが好ましい。変化させた環境要因を元に戻すことは困難であるため、菌数が  $1 \times 10^7$  cfu/ml程度以下の段階で該工程を適用すると、その後の増殖に時間がかかるてしまうか、pHや温度等を元に戻すための余分な添加物、工程までも必要となってしまい、 $1.5 \times 10^9$  cfu/ml以上まで培養してしまうと、菌の活性が低下してしまうためである。また、上記範囲であれば、培養の前半もしくは中盤において該工程を適用させるよりも、好適な生残性を得られるのである。

【0014】更に、該工程の作用時間は、1時間以上とすることが好ましく、2時間以上行うことがより好ましい。該工程の適用時には与えられた環境変化に対応するためのタンパク質等が誘導されていると考えられ、この誘導タンパク質が生残性改善に何らかの形で寄与していると考えられるため、充分な誘導を達成するには上記の作用時間を取ることが望ましいのである。ここで、菌の代謝を止めないために、上記の工程は温度 30℃～42℃の範囲内で行う必要がある。すなわち、従来の発酵乳等ビフィドバクテリウム属細菌含有飲食品製造工程で行われていた、培養液の冷却した後のシロップ液との調合、酸の添加等では、浸透圧差、pH差による環境変化が起きて、代謝が停止又は非常に延滞しているため、タンパク質等が充分に誘導されず、優れた生残性は得られない。本発明における菌の代謝を停止させずに増殖速度を低下させる工程をより詳細に説明する。

10

20

30

40

50

4

【0015】(a) 培養液中の溶存酸素量を増加させる工程

培養液中の溶存酸素を増加させる工程としては、培養槽(発酵槽)の攪拌工程；振盪工程；発酵槽内旁通気の酸素置換工程；無機物、微生物、酸素等の酸素発生(剤)を添加する工程等が挙げられる。これらの酸素供給手段等は、培養途中の溶存酸素量を増加させるものであればいずれも用いることができ、特に培養終点の4時間程度前から2～4時間程度の処理を行えば、高い生残性改善効果を得ることが可能である。このとき、培養槽中の溶存酸素濃度は2 ppm～培地中の飽和酸素濃度、特に3 ppm～培地中の飽和酸素濃度の範囲に維持することが好ましい。2 ppm未満では十分な生残性改善効果が得られないためである。

【0016】(b) 培養液の温度を変化させる工程

培養温度を変化させる工程としては、培養槽への温水又は冷水循環工程；高温に保持された水、乳培地、微生物の培養液又はシロップ液等を添加する工程、発熱剤の添加工程等が挙げられる。この場合にも、培養終点の4時間程度前から2～4時間程度の処理を行えば、高い生残性改善効果を得ることが可能であり、その培養温度は元の培養条件(例えば、ビフィドバクテリウム・ブレーベ、ビフィドバクテリウム・ビフィダムであれば30～39℃)から3～12℃変化させることが好ましく、特に6～12℃程度変化させた後維持することが好ましい。3℃未満の変化では、生残性改善効果がやや不十分な場合もあり、14℃以上では菌が死滅してしまう場合もあるためである。なお、温度変化としては、温度を上昇させることができより好ましいが、ビフィドバクテリウム属細菌の死滅を防ぐためには、42℃以下とすることが望ましい。

【0017】(c) 培養液の浸透圧を変化させる工程

培養液の浸透圧を変化させる工程としては、培養途中で培養液よりも浸透圧の高いシロップ液等を培養液に混合する工程；異なる濃度の乳成分を培養液に混合する工程；温水の混合工程；無機又は有機酸の混合工程等が挙げられる。この場合、変化させる浸透圧差は元の浸透圧によりやや異なるが、通常元の培養条件(例えば、通常の培地となる20%程度の乳培地では600mOsm程度)から150～800mOsm変化させることが好ましく、特に200～400mOsm程度変化させた後2時間以上維持することが好ましい。150mOsm未満の変化では、生残性改善効果がやや不十分な場合もあり、400mOsm以上では菌が死滅してしまう場合もあるためである。また、変化させた浸透圧を元に戻すことは、飲食品の製造工程上困難な場合が多いため、該工程は培養終点に合わせ適宜適用することが好ましい。なお、浸透圧変化としては、浸透圧を上昇させることができより好ましいが、(b)と同様の理由から最終製品の(又は工程の適用後の)最終浸透圧を1000mOsm以下とすることが望ましい。

(4)

5

## 【0018】(d) 培養液のpHを変化させる工程

培養液のpHを変化させる工程としては、培養液中への培養液への酸添加工程；異なるpHの培養液やシロップ液との混合工程等が挙げられる。この場合にも、培養終点の4時間程度前から2～4時間程度の処理を行えば、高い生残性改善効果を得ることが可能であり、そのpH変化の度合いは元の培養条件から0.3～3.0変化させることができが好ましく、特に0.5～1.5程度変化させた後維持することが好ましい。0.3未満の変化では、生残性改善効果がやや不十分な場合もあり、3.0以上では菌が死滅してしまう場合もあるためである。なお、pH変化としては、pHを低下させることがより好ましく、上記と同様に製品の（又は工程の適用後の）最終pHを4～5.5以下とすることが望ましい。また、酸添加で使用する酸は、クエン酸、リンゴ酸、乳酸、コハク酸、アスコルビン酸、酢酸、ピルビン酸等の有機酸、塩酸、硫酸等の無機酸等いずれもよく風味面からクエン酸、リンゴ酸、乳酸が特に好ましい。

【0019】上記工程は、いずれも容易に製造工程に導入できるものであり、これをそのままあるいは任意の他の方法と組み合わせることにより生残性を改善することができる。これらの工程は1種又は2種以上を組み合わせて使用してもよい。

【0020】一方、上記因子を与える工程以外の培養工程は、通常の培養条件を用いればよい。例えば、スター接種時の菌体濃度は0.05から5%程度、培養液の酸素濃度は通常0～2ppm(25°C)、浸透圧は150～900mosm、初発pHは7.5～5.5として培養を行えばよい。また、培養温度はビフィドバクテリウム属細菌各々の至適温度にあわせおよそ30°C～39°Cとして培養を行えばよい。その際に様々な培地成分を適宜添加してもよい。

【0021】本発明の方法に用いることの可能なビフィドバクテリウム属細菌の種類は特に限定されるものではなく、例えば、ビフィドバクテリウム・ブレーベ(*Bifidobacterium breve*)、ビフィドバクテリウム・ロンガム(*Bifidobacterium longum*)、ビフィドバクテリウム・ビフィダム(*Bifidobacterium bifidum*)、ビフィドバクテリウム・アニマーリス(*Bifidobacterium animalis*)、ビフィドバクテリウム・ズイス(*Bifidobacterium suis*)、ビフィドバクテリウム・インファンティス(*Bifidobacterium infantis*)、ビフィドバクテリウム・アドレセンティス(*Bifidobacterium adolescentis*)等が挙げられる。

【0022】中でもビフィドバクテリウム・ブレーベ及びビフィドバクテリウム・ロンガムは以前から乳製品に数多く使用され安全性等のデータが積み重ねられており、また、生残性の改善効果も高いため好ましい。

【0023】上記のようにして得られるビフィドバクテリウム属細菌の培養液は、そのままあるいは他の甘味

6

料、果汁、香料、増粘剤などと組み合わせて飲食物とすることができる。その食品形態としては、特に発酵乳製品、すなわち、牛乳、山羊乳等を乳酸菌により発酵させた飲料又は固形ヨーグルト等が好ましい。また、この他にも賦形剤等を配合した錠菓、健康食品、医薬品等として使用することも可能である。

【0024】また、ビフィドバクテリウム属細菌飲食品として、発酵乳製品を製造する場合、乳酸菌を含有してもよい。製品中に共存させる乳酸菌は特に限定されず、  
10 ラクトバチルス・カゼイ、ラクトバチルス・アシドフィルス、ラクトバチルス・ガセリ、ラクトバチルス・ヘルベティカス、ラクトバチルス・プランタラム、ラクトバチルス・デルブルッキー、ラクトバチルス・クリスピタス、ラクトバチルス・ファーメンタム、ラクトバチルス・ロイテリ、ラクトバチルス・ゼアエ等のラクトバチルス属細菌；ストレプトコッカス・サーモフィルス等のストレプトコッカス属細菌；エンテロコッカス・フェカリス、エンテロコッカス・フェンウム等のエンテロコッカス属細菌；ラクトコッカス・ラクチス等のラクトコッカス属細菌いずれも好適に使用することができ、特に、風味や食経験に基づく安全性などの点から、ラクトバチルス・ヘルベティカス、ラクトコッカス・ラクチス、ラクトバチルス・ガセリ、ストレプトコッカス・サーモフィルス、ラクトバチルス・カゼイ及びラクトバチルス・アシドフィルスが好ましい。また、これら乳酸菌とは別の微生物と併用して用いることも可能である。

【0025】用いる工程の種類、すなわち溶存酸素量、温度、浸透圧又はpHの変化を選ぶ際には、製品形態や設計、作業性等を考慮して選択することが好ましい。例えば、糖などを加えないブレーンタイプの発酵乳等の製品に用いる場合は、作業性等の点から溶存酸素量や温度を変化させる工程を適用することが好ましい。

【0026】また、糖類を添加し、pHの高いタイプの発酵乳等の製品を製造する場合は、浸透圧を変化させる工程を適用し、pHの低い製品にはpHの低下の工程を用いれば簡便に好適な生残性が得られる。

【0027】更に、保存時には通気性容器、嫌気性容器のどちらを使用してもよいが、嫌気性の容器を用いることがより好ましい。

【0028】

【実施例】次に実施例を挙げ本発明を更に詳しく説明するが、本発明はこれら実施例になんら制約されるものではない。

【0029】実施例1

溶存酸素量を増加させる方法による生残性改善効果  
以下の方法にて、溶存酸素量を増加させる方法のビフィドバクテリウム属細菌生残性改善効果を検討した。

【0030】すなわち、3リットル容コルベンに下に示す乳培地を添加し、ビフィドバクテリウム・ブレーベYT4065株を1%接種した。綿栓をした後、34

(5)

7

℃、11～12時間培養し、 $1.0 \times 10^9/\text{ml}$ の培養液を得た。この培養液のpHは5.7、浸透圧は560mOsm、溶存酸素量は約1ppmであった。その後100rpmで攪拌しながら4時間培養を継続したものと、2時間培養した後に更に2時間攪拌を止めて培養した培養液を2通り作製した。攪拌開始後120分後に培養液の浸透圧及び溶存酸素量を測定したところ、約590mOsm、7.5ppmであった。こうして得られた培養液は、いずれも $1.5 \times 10^9/\text{ml}$ 、pHは5.3であった。冷却したそれぞれの培養液に、冷パラチノース溶液を終濃度0.3モルとなるように添加し、ガラス製の試験管に充填し空気に触れないようにブチル栓で密栓した。また、対照として、培養中に攪拌せずに、 $1.5 \times 10^9/\text{ml}$ まで培養した培養液を用いた製品も同様に作製した。この様にして得られた製品群の10℃保存時における7、14、21日の生残率を測定した。結果を表1に示す。

## 【0031】(乳培地組成)

全脂粉乳	520g
酵母エキス	0.75g
水	2100g

\*溶解後、135℃で5秒間、滅菌処理した。

## 【0032】

【表1】

	1日目	7日目	14日目	21日目
対照	100	64.2	39.3	22.1
攪拌操作4時間	100	68.5	52.5	41.2
攪拌操作2時間	100	66.0	40.3	29.4

単位(%)

10

20

【0033】この結果から明らかなように、培養途中で一定期間攪拌を行って製造した製品は、未攪拌で培養して製造した製品の場合よりも高い生残性を示していた。

## 【0034】実施例2

温度を上昇させる方法による生残性改善効果

以下の方法にて、温度を上昇させる方法のビフィドバクテリウム属細菌生残性改善効果を検討した。

【0035】すなわち、3L容コルベンに実施例1と同じ乳培地を添加し、ビフィドバクテリウム・ブレーベYIT4065株を1%接種した。綿栓をした後、34℃、11～12時間培養し、 $1.0 \times 10^9/\text{ml}$ の培養液を得た。この培養液のpHは5.7であった。この培養液の温度を37、40、42℃の各温度に上昇させた後、4時間培養を継続した培養液、及び42℃に昇温後2時間培養してから34℃まで温度を下げ、更に2時間培養した培養液を得た。これらの培養液は、菌数が $1.59 \text{cfu}/\text{ml}$ 、pH 5.3であった。冷却した培養液に、冷パラチノース溶液を終濃度0.33モルとなるように添加し、ガラス製の試験管に充填し空気に触れないようにブチル栓で密栓した。また、対照として、培養中に温度を上昇させずに $3.0 \times 10^9/\text{ml}$ まで培養した培養液を用いた製品も同様に作製した。この様にして得られた製品群の10℃保存時における7、14、21日の生残率を測定した。結果を表2に示す。

## 【0036】

【表2】

	1日目	7日目	14日目	21日目
対照	100	64.2	39.3	22.1
温度上昇(37℃)	100	65.6	42.1	25.0
温度上昇(40℃)	100	75.0	52.1	38.0
温度上昇(42℃、4時間)	100	81.6	71.4	51.6
温度上昇(42℃、2時間)	100	80.7	68.2	45.7

単位(%)

40

50

I T 4 0 6 5 株を 1 % 接種した。綿栓をした後、34℃、11～12時間培養し、 $1.0 \times 10^9/\text{ml}$ の培養液を得た。この培養液のpHは5.7また浸透圧は約640mOsmであった。この培養液に34℃に加温したパラチノース溶液(約1300mOsm)を終濃度0.33モルとなるように添加した後、4時間培養を継続し、 $3.0 \times 10^9/\text{ml}$ の培養液を得た。この培養液のpHは5.4、浸透圧は約950mOsmであった。冷却した培養液を、ガラス製の試験管に充填し空気に触れないようにブチル栓で密栓した。また、対照として、培養中にパラチノース溶液を添加せずに $3.0 \times 10^9/\text{ml}$ まで培養した培養液に、冷パラチノース溶液を添加した製品も作製した。

【0037】この結果から明らかなように、培養途中で培養温度を34℃から37、42℃に上昇させて製造した製品は、34℃一定で培養して製造した製品よりも高い生残性を示していた。処理温度は37℃よりも42℃の方が、また処理時間は2時間より4時間の方がより高い生残性を示した。

## 【0038】実施例3

浸透圧を上昇させる方法による生残性改善効果

以下の方法にて、浸透圧を上昇させる方法のビフィドバクテリウム属細菌生残性改善効果を検討した。

【0039】すなわち、3L容コルベンに実施例1と同じ乳培地を添加し、ビフィドバクテリウム・ブレーベY

(6)

この様にして得られた製品群の10℃保存時における7、14、21日の生残率を測定した。結果を表3に示す。

## 【0040】

【表3】

	1日目	7日目	14日目	21日目
対照	100	64.2	39.3	22.1
浸透圧上昇	100	79.2	58.0	40.4

単位(%)

【0041】この結果から明らかなように、培養途中で温パラチノース溶液を添加し、浸透圧を上昇させて製造した製品は、浸透圧を上昇させずに培養して製造した製品の場合よりも高い生残性を示していた。

## 【0042】実施例4

培養液のpHを変化させる方法による生残性改善効果  
以下の方法にて、培養液のpHを変化させる工程のビフィドバクテリウム属細菌生残性改善効果を検討した。すな\*

	1日目	7日目	14日目	21日目
対照	100	64.8	40.0	19.5
pH 4.4, 2時間	100	65.3	49.0	28.2
pH 4.4, 4時間	100	75.1	52.0	38.0
pH 5.4, 4時間	100	66.6	50.7	31.0

単位(%)

【0044】表4から明らかなように、培養途中にpHを低下させ製造した製品は、対照よりも高い生残性を示していた。処理後のpHは5.4よりも4.4の方が、また処理時間は2時間より4時間の方が高い生残性を示した。

## 【0045】実施例5

浸透圧を上昇させる工程による生残性改善効果  
以下の方法にて、浸透圧を上昇させる工程のビフィドバクテリウム属細菌生残性改善効果を検討した。

【0046】すなわち、3リットル容コルベんに実施例1と同じ乳培地を添加し、ビフィドバクテリウム・ブレーベYIT4065株を1%接種した。綿栓をした後、34℃、11~12時間培養し、 $1.0 \times 10^9/\text{ml}$ の培養液を得た。この培養液のpHは5.7また浸透圧は約590mOsmであった。この培養液に34℃に加温した1Mパラチノース溶液を培地の浸透圧との差が74、134、230、262、353mOsmとなるように添加した後、4時間培養を継続し、 $1.5 \times 10^9/\text{ml}$ の培養液を得た。この培養液のpHは5.3であった。冷却したそれぞれの培養液に冷却した1Mパラチノース溶液をいずれも0.33Mとなるように添加した後、ガラス製の試験管に充填し空気に触れないようにブチル栓で密栓した。また、対照として、培養中にパラチノース溶液を添

\*わち、3リットル容コルベんに下に実施例1と同じ乳培地を添加し、ビフィドバクテリウム・ブレーベYIT4065株を1%接種した。綿栓をした後、34℃、11~12時間培養し、 $1.0 \times 10^9/\text{ml}$ の培養液を得た。この培養液のpHは5.7であった。2Mリンゴ酸溶液を用いて培養液のpHを4.4、5.4に低下させ34℃にて4時間培養を継続した。pH4.4のものののみ培養2時間の培養液も得た。いずれも菌数 $1.5 \times 10^9/\text{ml}$ の培養液であった。冷却したそれぞれの培養液に2M水酸化ナトリウム溶液を添加しpHを5.3とした後、冷パラチノース溶液を終濃度0.33モルとなるように添加し、ガラス製の試験管に充填し空気に触れないようにブチル栓で密栓した。また、対照として、pHを変化させる処理を施さずに $1.5 \times 10^9/\text{ml}$ まで培養した培養液を用いた製品も同様に作製した。この様にして得られた製品群の10℃保存時における7、14、21日の生残率を測定した。結果を表4に示す。

## 【0043】

【表4】

	1日目	7日目	14日目	21日目
対照	100	64.8	40.0	19.5
pH 4.4, 2時間	100	65.3	49.0	28.2
pH 4.4, 4時間	100	75.1	52.0	38.0
pH 5.4, 4時間	100	66.6	50.7	31.0

加せずに $1.5 \times 10^9/\text{ml}$ まで培養した培養液に、冷パラチノース溶液を添加した製品も作製した。この様にして得られた製品群の10℃保存時における7、14、21日の生残率を測定した。結果を表5に示す。

## 【0047】

【表5】

浸透圧差mOsm	1日目	7日目	14日目	21日目
対照	100	64.6	40.0	21.4
74	100	59.1	41.0	21.2
134	100	65.4	42.4	21.5
230	100	64.6	42.6	28.6
262	100	67.4	43.4	35.3
353	100	79.8	57.9	39.8

単位(%)

【0048】表5から明らかなように、浸透圧差が134を超えると、対照よりも高い生残性を示していた。

## 【0049】実施例6

溶存酸素量を増加させる方法による生残性改善効果  
菌株としてビフィドバクテリウム・ロンガムYIT4021を用いた以外は実施例1と同様の条件で、溶存酸素

(7)

11  
量の生残性への影響を検討した。その結果ビフィドバクテリウム・ロンガムでも同様に生残性改善効果が得られた。

**【0050】実施例7**

以下の基本培養条件に各種の条件を適用して発酵乳を調製し、保存時の生残性を比較した。

(基本条件) 粉乳420gとミースト(アサヒビール社製)0.6gを水1700gに溶解し、135℃で3.5秒間滅菌したものを3リットル容コルベンに2L分注し、乳培地とした。この乳培地に、ビフィドバクテリウム・ブレーベYIT4064株を1%、ラクトバチルス・ガセリYIT0168を0.1%接種した。綿栓した後、34℃でビフィドバクテリウム・ブレーベの菌数が $1.5 \times 10^9$ となるまで培養し、培養液とした。この培養液を10℃に冷却し、4℃の1Mグルコース溶液1Lと混合し、均質化機で150kg/cm<sup>2</sup>の圧力で均質化し発酵乳とした。こうして得られる発酵乳(コントロール)と以下の各種条件を具備したサンプルを調製した。

実施品1：培養終了4時間前から2時間攪拌を行い、攪拌中は培養液の溶存酸素が飽和状態になるように維持した。

実施品2：培養終了4時間前から培養終了まで培養温度を42℃に維持した

実施品3：培養液と1Mグルコース溶液との混合を34℃で行った。

実施品4：ビフィドバクテリウム・ブレーベの菌数が $2 \times 10^8$ の段階でクエン酸を添加し、pHを1.0低下させ2時間維持した後、水酸化ナトリウム溶液で元のpHに戻し、培養を継続した。

実施品5：培養終了4時間前に1Mグルコース溶液との混合を攪拌しながら42℃で行い、培養終了まで攪拌及び42℃恒温を継続した。

こうして得られた発酵乳をガラス瓶に充填、密封し、10℃で21日間静置保存した。結果を表6に示す。

**【0051】**

**【表6】**

	1日目	7日目	14日目	21日目
コントロール	100	60.6	33.4	19.1
実施品1	100	67.3	42.5	30.2
実施品2	100	76.3	64.9	42.2
実施品3	100	75.5	56.0	38.8
実施品4	100	69.9	52.4	40.3
実施品5	100	85.2	77.0	64.1

単位(%)

12

【0052】表6から明らかに、ビフィドバクテリウム属細菌の代謝を停止させずに増殖速度を低下させる工程を具備することで、優れた生残性を有する発酵乳を製造できることがわかった。特に培養終了時から4時間程度前までに該工程を適用した場合の生残性改善効果が優れていた。また、本品は21日保存後でも色調変化、分離、沈殿等はほとんど見られず、良好な安定性を示した。更に、本品は、官能面でも全く問題ない優れた風味を有していた。

**【0053】実施例8 発酵乳の製造**

3リットル容コルベンに全脂粉乳520gとミースト(アサヒビール社製)0.75gを水2100gに溶解し、135℃で5秒間滅菌し、乳培地とした。この乳培地に、ビフィドバクテリウム・ブレーベYIT4065株を1%、ラクトバチルス・アシドフィルスを0.1%接種した。綿栓をした後、34℃、11~12時間培養し、 $1.0 \times 10^9/\text{ml}$ の培養液を得た。この培養液に34℃に加温した1Mパラチノース溶液0.84Lを添加した後、4時間培養を継続した。 $2.0 \times 10^9/\text{ml}$ の培養液を得た。この培養液を均質機にかけ均質化したものを作った。この発酵乳のpHは5.4、乳酸菌数は $5 \times 10^7/\text{ml}$ 、ビフィズス菌数は $1 \times 10^9/\text{ml}$ であった。

**【0054】**

**【発明の効果】**本発明により、ビフィドバクテリウム属細菌の代謝を停止させずに増殖速度を低下させる工程を単独もしくは組み合わせてビフィドバクテリウム属細菌の培養時に導入すれば、ビフィドバクテリウム属細菌の生残性を改善し、摂取時の生理効果を高めることが可能となる。また、本発明方法によって得られた培養液又は培養物は良好な風味を有しており、多種類の飲食品に用いることができる。

(8)

フロントページの続き

(72)発明者 三浦 みか  
東京都港区東新橋1丁目1番19号 株式会  
社ヤクルト本社内

(72)発明者 池邨 治夫  
東京都港区東新橋1丁目1番19号 株式会  
社ヤクルト本社内

(72)発明者 森下 ▼隆▲  
東京都港区東新橋1丁目1番19号 株式会  
社ヤクルト本社内

F ターム(参考) 4B001 AC02 AC30 AC31 AC50 AC99  
BC03 BC14 EC05  
4B018 LB07 LB08 LE04 LE05 MD28  
MD29 MD81 MD86 MD87 ME02  
ME11 MF13  
4B065 AA21X BB15 BB16 BB24  
BB29 BC01 BC02 BC03 BC14  
BC50 BD07 BD12 BD36 CA42